

**TRYPTOPHAN OPERON, PEPTIDE AND PROTEIN CODED THEREBY, UTILIZATION OF TRYPTOPHAN OPERON GENE EXPRESSION AND PRODUCTION OF TRYPTOPHAN**

[71] **Applicant:** AJINOMOTO CO INC

[72] **Inventors:** MATSUI KAZUHIKO;  
SANO TAKANOSUKE;  
MIWA KIYOSHI;  
OTSUBO EIICHI

[21] **Application No.:** JP61087600

[22] **Filed:** 19860416

[43] **Published:** 19871024



[Go to Fulltext](#)

**[57] Abstract:**

**PURPOSE:** To efficiently produce the titled tryptophan in a large amount, by cultivating a microorganism transformed by a DNA sequence capable of coding an enzymic group of a tryptophan synthetic system, etc., in a culture medium.

**CONSTITUTION:** A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of *Brevibacterium lactofermentum*, etc., of the genus *Brevibacterium* is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RNA, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium. **COPYRIGHT:** (C)1987,JPO&Japio

**[51] Int'l Class:** C12N01500 C07H02104 C07K01300 C12P01322

C12P02102 C12P01322 C12R00113 C12P01322 C12R00115

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭62-244382

⑫ Int.Cl.\*

C 12 N 15/00  
C 07 H 21/04  
C 07 K 13/00  
C 12 P 13/22

識別記号

府内整理番号

7115-4B  
7138-4C  
8318-4H

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

A-7236-4B※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされる  
ペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法  
及びトリプトファンの製造法

⑮ 特願 昭61-87600

⑯ 出願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」により発表

⑰ 発明者 松井 和彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑱ 発明者 佐野 孝之輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑲ 発明者 三輪 清志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑳ 発明者 大坪 栄一 東京都文京区西片1-13-6  
㉑ 出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファン  
オペロンにコードされるペプチド及び蛋白、  
トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用  
方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) mRNA の合成をコントロールするオペレーター領域、mRNA の合成をコントロールするプロモーター領域、mRNA の合成をコントロールするアティュエーター領域、蛋白合成に必要なリボゾームとmRNAとの結合領域、リーダーペプチドをコードする領域、トリプトファン合成系の酵素群をコードする領域及び最後にmRNAの合成を停止させるシグナルを形成するターミネーター領域が含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCCCCCTTGTG CCCATTGTC TCCCTGAGGT GCGTAATACTC CAAGAATTTG CCGATATGGC CCACCGTTCG CTGGGCCCCG TGTEGGTGCCT GTGGGAGTT  
 GGGCAACAC CGCTAACAC AGGGACTCCA CCCATTAGG GTCTTAACA CCTATACCG CGTGGCACAG CGACGGGCA ACACCCACGA CAGGCCCTCA  
 TCCTTCTTA TTGCTCGCT AGTCCGTT GTGGCTTCT GTGGATCT GGCTGGTCTG GGCTATGGGT GTTGCTGCTG CCATCGTGT CATGGCATG  
 ACCAAACAT AACGGACCGA TCAACCCAAA CACCGAAGA CCAACCTACA CGGACCCAGCA CGTAAACCCA AAACACCGAC GTAGCACAA GTAACGGTAC  
 GGTCGGGTA TGGCTGCCA TACTGTTGG ATGGTGATG CGAACCGAGT CCCGAAACCC CGCAGGGCC TGTTCGGT GAAATGAG AGGAGGCCCC  
 CCACGGCAT ACCGACGGT ATGACAACCC TACCAACTAC GTCTGGTCA CGCTTGGGG CGCTGGGGG ACAGGACCGA CTTAACCTTC TCCCTGGG  
 TGCTGACT ATTACCTCG CGATTATCAA CGAGCTCG CTGAAATGCC ECAACATGCA CTGCGATGCA GTGGCTAGAG GTGGGAAAC TACACANAGA  
 ACCACACTGA TAATGGAGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGG GACTTACGGG GTTCTAACT GAACCTACGT CACCGATCTC GACCCCTTTC ATGCTTCTT  
 CCCAAATAATG ATTAATAATI GAGACAGCT TCCCACATG TGATAAAAGTC CCATTTCTG AATAACTCTT GTCTGACTCA AAGCACCCAG TGGTGGTGGC  
 GGGTTTAC TAATTATTA CTCTGTCG ACGGTGATAC ACTATTCAG GTAAAACAC TTATTGAGAA CAGACTCAGT TTCGTCGGTC ACCACCCAG  
 CGCTAACTA AGCGACCTCG ACACCTCAAG TTGTTTAC TTTGATGAA TTTTAAGGC TCGTACTTCC TCGGACGGAG AGGGGGGCT TTGTCGGTT  
 CGCGATTGAT TCGCTGGAC TGTGGACTTC AACAAAGTG AAACACTTA AAAATCCG AGCATGAGC AGCTGCTTC TCGGCCCCGA AAACACCAA  
 TTACCCCCACA ACCGGCAAGC CGCTGGATGCA ATGAACTCG CAGCAGTAA TTATTCAGT TTCCAGAA AGCCTTCAGC CCCACAATG AATCCCTCGT  
 AATGGGTGTG TGGCGTTCG CGACCTACT TACTTCCAGC GTCGCTCATT AATAACTAC AAAGGGTCTT TCCGAAAGTGC GGGTGTACT AAAGGAGCCA  
 AGGTGGGCGA TGAGCACGAA TCCCCAICIT TTCTCCCTAG ATGTCGGCTA TCACGGGAT GTCTGGCT TGTTCGGCA CTTGGTGGC ACAACCCAG  
 TCCACGGGGT ACTCGTGGT AGGGTACAA AGAGGGATC TACAGGGAT AGTCTCCTA CGAAGACGCA ACAGGGGGT GAACCCACCG TGTTCGGCTC  
 ATGATGGAGC CCTGTTGGAA ACCGCTGATA TCACCCACAA GAATGGTATT TCTTCCCTG CGTGGTGTGAA GAGTTCGGT GCATTACGT GCACGGGAA  
 TACTACCTCG CGACAACCTT TCGGACTAT AGTGGTGGTT CTTACCTAA AGAGGGAGC CGCACAACTT CTCAGGAC CCGTAATGCA CGRPCCCGT

CAGGGTGGTA AGCGACCCCG TGACGGACTC CGGTAGGGCA GTGGTGGCC CCCTAACACA CGACCTTGGC CAGTACAACA CGCGAGAGAA CACCTTACG  
 GTGGCACCAT TCGCTGGCG ACTGGCTAG CCCATCCGT CACCAACGG CGGATTGCTG CCTGAAACCG GTATGTTGTG GGCCTCTT GTGGAAATCG  
 TTCCCCCGCT CGCATGGGT TGATGAGGGC GAGGGCTCA CGGACCAACG CACCATCGAA GTGCTGGCA ACTGGCAGTT CGAGTCCGGC TACAGGGAGC  
 AAAGGGGGGA CGCTACGGCA ACTACTCGG CTGGGGAGT CGCTGGTTC GTGGTAGCTT CACGACGGCT TCAACCTCA CCTCAGGGCG ATGCTCCCTG  
 CCTCCCTGCC ACTGCTCATG GCGGTTTCC CTTTGGATT CTIACARACC TTGAAACCC TCCCGGGAGT CGAGGAAAGC GTCAACACTT ACGGGGATTA  
 CGAGGGAGCG TGACGAGTAC CGCCCAAAGC GGAAACTAAA GAATTTGGG AAACCTTGGG AGGGGGCTCA CCTCCTTCC CAGTTGTGAA TCGGGCTAAT  
 CGAGTTGTC CTGGGGAAA TCGTCTGGA CATCAATCAC CAGGACCGAGA CGCCCAAACG CACCCGGTC TCCAACCCCC CAGGGAGCT CGAGGGGGAG  
 GTCAACAGG GAGCGCTT ACCAGGACCT GTAGTTAGT GTCTGGTCT GGGGTTGA GTGGGGAG AGGTGGGGG CTCCGCTGA CCTCCGGCTC  
 CTCAACAAAG TTTCATTGCT TATGGAGGG CGCTCCCCG CAACCGAACA CGCTTACCAA ACCACCCCTC ACCACGGGCA CACTGTTGGC GTGTCGGCTG  
 GAGTTGTTG AAGTAACCA ATGCTCGG CGGGAGGGG GTGGCTTGT GGGGATGTT TGGGGAG TGTGCCCCGT GTGAGAGCC CAACACCGAC  
 ATATTCGGCA TGCTCACTTC CGCACTCAGA TCAATGAGCT GAAAGAAAAC ATTTACACG GTGACATCTA CCAAGTTGTC CGGGGGGGCA TTTCACCCG  
 ATATTCGGCT ACCAGTCAAG CGCTGAGTCT AGTACTCGA CTTTCTTTG TAAATGTTG CACTGTAGAT GGTCAACAG GGGGGGGG GAAAGTGGG  
 ACCATGTCCT GATGCTTCT CGCTTATCT CGAGCTGGT GCCACCAACC CGTGGGGCTA CATGTTCTAT ATCCGTCAC TCAACGAAGG TCGCTCTAT  
 TGGTACAGGA CTACGTAACC GAGGAATACA CGTCCACCCA CGTGGTCTG CGAGGGCAT GTACAACATA TAGGCACCTG AGTTGTTCC AGCGAGGATA  
 GAACTTTTC CGGCATCCCC TGAGTCCAACT CTCAGGTTCA CGCTGGCTAA CGTGGAGCTG CAGCTGAGC CAATGGCAGG TACCCGGGGCA CGTGGACTCA  
 CCTGAAAGC CGGGTAGGGG ACTCAGGTTG GACTTAACT GGGCACGATT CGCACCTGAC GTGACATGG GTAGGGTCC ATGGGGGGG CGACCTGAGT  
 ACCCAGATGG CTCCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCGCAA TGAGTGGAT ATGGCAGTC ATGCAAGA GATCCGGAC GACACCATGC TTGTCGATCT  
 TGGTCTACC GAGGTAGTGT CTACTCGATC TATAGGGCTT ACTCAACCTA TACGGCTGAC TACGGTTCT CTCAGGGCTG CTGTCGGTAC AACAGCTACA  
 CGGGGGGGGG GACCTGGCCC CGGTCTGGGT CCCAGGCTCG CGGGGGGGT CGGATCTTGT CGAGGTGGAT CGCTATTCCC CGGTGATGCA CTTGGTGTG  
 CGGGGGGGGG CGCACACCA CGTGGCAGC CGGGGGGGGG CGCTAGAAA CGTCCACCTA CGTATAAGGG CGCACTACCT GAACACACGG

特開昭62-244382 (3)

CGCTGTGACGG CCCAGGTGGA CCCAGAGCTT GATGCTTTGG ACCGCCTATCG CCCGTCGATG AATATGGGCA CGTTGACCCGG CGCTCCGAG TTGGCCCCCTA  
 GCACACTCCC GCTGCAACCT GGCTCTCGAA CTACGAAACC TCCGGATAGC CCCGACGTAC TTATACCCGT GCAACTGGCC CGCAGGGCTTC AACGGGGCAT  
 TCGAGETGCTT CGCGGGCGTC GAAAAGGCCA GGCGTGGCTTC TTATGGTGGG CGAGTGGGGT ACETGGGGG CAATGGGGAT ATGGATAATT CGATTGTTAT  
 ACCTCGACAA CGGGGCGGAG CTTTCCCGT CGGGACCCAG AATACCAACCC CGTACCCCCA TGAGCCCCC GTTACCGCTA TACCTATTAA CGTAACATA  
 TCGTTCGGGG TTTGTCAGG ATGGTGTGGC TGCTGTGAG GCTGGTGTG GTGCGGCTCG CGATCTAAT CTCATCTC AACGGGATGA GACGTTGCCAC  
 ACCAAGGGCGG AAACAGGTCC TACCAACCCG ACCGACCTGC CGACCCAGAC CACCCAGGC GCTAAGATTA CGAGTTAGAC TTGGCTACT CTGCAACGTC  
 AAGGGTATG CGCTGTGAA TGCCATTGCG CTGCTGCTG GTTCACTT GGAGCTCATC CGATCACACA CGTTGTTCTC ATTGATAATC AGGATTCTT  
 TTCCGCATAC CGCACACACTT ACGGTAACCCG GAACGACCGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAAGAG TAATATTAG TGCTAACAAA  
 TCTCTACAAAC CTGGTGGATG CGTTGGCGT GGGCGGTAT AAGTCCACGG TGTCCCGAA TACGGTGCCA GTGAAACCA TTTGGCAGC CAACCCGGAC  
 ACAGATTTG GACCACTAC CGAACGGCA CGGGGAAATA TTACCGTGC ACAGGGCGT ATGCCACCGT GAACTTGTG AAAACCGTCC TTGGCCCTG  
 CTGATCTGCC TTTCACCTGG ACCTGGTAC CTCGGGATG CGGGCAACAT GATGGGGCTG ATGGAGGGCA CACTGGGCA GATTCCTTA CTGGCTATT  
 GACTAGACGG AAAGTGGACC TGGACCAATG CGACGGCTAC CGGGTTGTA CTACCGGAC TAGCTGGCT GTGAGGGGT CTAGGAAT GACCCATAAA  
 CGCTCGGCTA CCAGGCACTC ATCGAATACC ACGGGGCAA GTGAGGGCT TGTGGGGCTG TCCACGGCAC CACCCACAAAC ATGATCTTA CTGATGCCAC  
 CGGAGGGAT GTGCGCTGAG TAGTTATGG TGCCGGCGT CCAACTCGGA ACACGGGAC ACCTGGGCTG GTGGCTGTC TACTAGGAAT GACTACGTC  
 TGTGAGGAGC CTCGTTTTC CAGCTCTG CACTGATGTT GACCGTGTAC ATCCAGAACT CCCAGGGGG AAGGTTCCAA TTGGCCGTTA TCACTCACTG  
 ACACGCTCG GGACAAAAAC GTCCAGAACG GTCACTACAA CTCCGACTAG TAGTTCTCA GGGTCCGGCG TTCCAAGGTT AACCCCCAAT AGTGAGTGAC  
 CGCTCGGTCG TTGCCCCAGA CGGTATTGAA TCATTGGCA CCTGTCCTC TGAGATGGT GATGTCATCA TGCGGGCACG CACCCACCGT CGAAAGGCCA  
 CGCACCCACC AACGGGGTCT CGCATAACTT AGTAACCCGT GGACAGGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT AACCCCCGTC GTGGCTGGCTA CTTTCCGGT  
 TTGGCCTGCA TTTCACCCCT GACTCAGTC TGAGCCAAC CGGTCCTATC ATTTGTCCTC GCTGTGTCGA ARACTTCTC CGCAACTAAT AAAAGGATT  
 AACCCGAEGT CAAACTGGGA CTCACTCACG ACTCGGGTTG CCCAGGATAG TAAACAGGG CGACACAGCT GTTCAAGAG CGCTTGATTA TTTTCTAA

TGATTCATGA CTTCTCCAGC AACACTGAAA GTTCTCAACG CCTACTTGG AATACCCACT CGAACCCCTG AGGAGGCAAT TGAGCTCTC ACCCCCCCTGA  
 ACTAAGTACT CGAACGGCTCG TTGTGACTTT CAAGAGTTCG GGATGAACTT ATTGGGTCA CCTGGGCTC TCCCTGGTTA ACTCCACAAAG TGGGGCGACT  
 CGCTGGGTGA ATACGATGAC GTGCACATCG CACCGCTGCT TCCGACCATC CGTACTCGG GTGAGGACTT CGCTGATATT GCGGGCGCTG CGAACGGATT  
 CGCACCCACT TATGCTACTG CACCTGTAGC GTGGCGACCA ACCTGGTAG GCATGACCGC CACTGGTCA CGGACTATAA CGGGGGCGAC CGTCCGGTA  
 CCTCGGGGG CGCTCTCCGT TCCCGATTAC TGGCGAGGT TTGCTAGATT CGGCTGGCAC TGGTGGGGAC GGTGCAACAA CGATCAACAT CACCCACCGG  
 CGAGGGGGCG CGAGCAGGGCA AGGCTTAATG ACGCGTCAA AACGATCTAA GGGGACCGT ACCACCGCTG CGACCGTTGT GGTAGTTGTA GTGGTGGGG  
 CCTTCCCTGA TCGCAGGATC CGGTGGACTC AAGCTGGCTA ACCACGGCAA CGGTCACTG AGCTCCAAGT CGGGTCCCG CGATGTGCTG GAGGGCTGA  
 CGAACGGACT AGGCTCTAG CGCACCTCAC TTGGACCGAT TGCTGGCGT GCAACTCAC TCGAGGTICA CGCAAGGGC CGTACACGAC ATCCGGACT  
 ATATTCTTT GGGCTTGAT GTGGATCTG CTGTGAACTG TTGCAAGGG TCCAACCTCA CCTCTCTT CACACCTGG TACAACCTG CGATTGGCCA  
 TATAAGAAA CCCGGAACTA CACCTAGCAC GACACTTCAC CAAGCTTCCC AGGTGAACTT GGAGGACAA GTGTGGACCC ATGTTGGGAC CGTACACCGCT  
 TGTGCAAGGG CGTGGCCAGG CGCTGAAATT CCCACCCATC TTCAACACCC TTGGACCATT GGTGTCCTCC GCGGGGGGG AGGCTCAGAT CATGGGGCTG  
 ACACGCTGGC CGACCTTAA GGGGTGCTAG AGTTGTCGG AACCTGGTA CGACAGGGGC CGGGGGGGCC TCCCAGTCA CTACCCGGAC  
 CGCAATGCCA ATCATGCCA GCTCATGCC GAGCTCTTCC GCGACCTGG CGCTACACCC CGCTTGTG TGCACTGGCC AGCCACCGAT GAGATGCCAG  
 CGCTTACGGT TAGTAGCTG CGAGTACGG CGCTGACCC CGCTGACCC CGCAAGTGG CGCGAACAAAC AGCTACGGCG TCCGTGGCTA CTCTACCGTC  
 TCCACGGGAC CACCTGGT GGGGACCTA AAGAAGAGGG CACCATGGAG CATTACCCA TCGAGGCTGA CGACCTTGGC CTGGGGGGT ACACCTTGA  
 AGGTGGGGCTG GTGGAAACAC ACCCTCGAA TTCTTCTGCC GTGGTACCTC TAAATGTTG AGCTGGACT CCTGGACCC GAGGGGGCA TGTGGAACT  
 CGATCTCTG GTGGGGCTG GCACTGAGAA CGCCGAAGCT ATGGGGCTA CCTTGGGGG CACCCGGCTT GATCCACACC GTGATCCCTT CGCTGGCTCC  
 CCTAGAGCAC CGACCTCTT CGGGCTTCA TACGGGGAT GAAACGGCCC GTGGGGGGG CTACGTTGCG CACTACGCCA CGAACGGAG  
 CGAGCTGGCA TGTCTATCT CAACGGGGAT GTGGACTCT TGAGGATGG TGCACAAAG CGGCTTCTCT TGTTCCTGA CGGGACCCAC CAGGCATGGT  
 CGTCCACGGT ACAAGATAGA GTTGGCTGCA CAGCTGAGGA ACTTCCTACC AGGTGTTTG CGCGAACGGC ACCAACGGCT CGGCTGGTGG CTCCGCTACCA

特開昭62-244382 (4)

TGGCCAAAGCA CGAAGAGACAT CATTACTCAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TACTAATAAT CTGGCCACGG TCTTGGAAAG CATCGTGGAG GGTCTGTCGG  
ACCGGTTGCT CCTTCTCTAG CTAATGAGTC TTTTCTCTAG AAGGTTACTG ATCATTATTA GACGGGTCCC ACACCTTTC CTAGCACCTC CCAGCAGGGC  
CACACCTGGA CGAAGATTGCG CTCACGCTGG TCTGGATGGG CTTCCAAAAT CCACCCGCTC TCTCTTCGAT TCCCTCAACC AGGGTAGGG  
CTGTGGACT CCTTAAAGCG CGACCGTACG GAGTCGACCT ACACCTACCC GAAGCTTITA CCTGGGGCAG AGAACAGCTA AGGGACTTGC TCCCCTCCCC  
AGGGGGCGT TTCTCATCATGG AGTCCAAGTC CCCATCGCC TCTTGGGAA TGATTCGTGA GCACTACCCAG CGGGGTGAAA TCGCTGGCGT GTACTCTCGC  
TCCCCCGCA AAGTAGTACG TCACGTTCA CGCTAGGGGAG AGAAACCCCT ACTAAGCAGT CGTGATGCTC GCCCCACTTT AGCGAGGCA CATGAGAGGG  
TACGCCACGGG CAATTCGGT CCTGTCGGAG CGGGATCGTT TTGGTGGCGA TTACGATCAC CTGCTACCC TTGGCGCTAC CTCTCATCTT CCGGCTGCT  
ATGGCTCCC TTAAAGCGA CGACACGCTC GGCGTAGCAA AACCCCGCTT AATGCTACTG GAGGGATGGC AGCGGCGATG GAGACTAGAA GGGCACCGACA  
GCAAGACTT CATCATTGAT CCTGTCAGG TACGACGGG GCCTTACTTT GTGCTGATG CCATCCTGCT CATGCTCTCT GTGCTTGATG ATGAAGAGTA  
CTTTCTGAA GTAGTACTA GGACAGGTCC ATGCTGGGG CGCAGATGAA CCACGACTAC CGTACGGACGA GTACGGAGAGA CACGAACTAC TACTCTCAT  
CGACGCACTC CCTGGGGGAGG CTGGGGGTT TGATTCGAT ATCCCTACCG AGGTTATGAG TGAGGAGGA CTGGGGGGCG CCATCAAGCT GGGTGGGAAG  
GCTGGTGGAG CGACGGCTCC GACCGGCAAA ACTACACCTA TAGGAGTGGC TCCAATACCT ACTCCCTCCTT GAGGGGGCGC GTAGTTGCA CCCACGCTTC  
ATCTTGGGG TCAACCAACG CAACCTGCAT GATCTGCTCA TTGATTCGGA TCGTTACCGT CCCTCTGCA AGCTCATTC ACCAGATGCC GTGCTCGT  
TAGAAACCCC AGTGGTGGC TTGGACGCTA CTACACAGGT AACCTAAACCT ACCAAGTGCAG CGGGACAGGT TCGACTNAGG TCGCTACGG CACGAGCACA  
CTGACTCTGG CGTGGGGGAGT ACCGAAACGG TCGCCAGCT AGGTGGGAC TCCATGAT TCCCTGTTGG CTGGCAGCTG ACCAGGCAAGG AAAACGTCGA  
CACTCAGACC GCACCCGCTA TGGCTTGGG AGGGGTGCA TCCACCCGTC AGGTTACGTA AGGACGGAAAC GAGGGTGGAC TGGTGGTCC TTTTCCAGCT  
TCTGGCAGCC CGGCAATTGG TCTACGGCCC CAACAAACTC TCGGACTCA CCTCACCAAG TGCAACCAAAC CGGGCTGGG CAGGGGGTGC GGTCTACGGG  
AGACCGCTGG GCGCTAACCG AGATGGGGG GTTGTTCAG ACCCTGAGT GGAGTGGTC ACCTGCTGTT TGGCAGGGC GTCGCCACG CCACATGGGG  
GGGCTCATCT TCGAACAGGG ATGCCACGT AATCTTCACT GTGAAACATC GCAAAAATC ATGCCACGG AGCCCAACCT GGGCTACGTC GGGCTCACCC  
CCCCAGTACA AGCTTCTCCC TAGGGTGCAG TTACAAAGTC CACTTTAG TACGGGGCTC TCGGTTGGAG CGCGATGCA CGCCAGTGG  
CTGCTGTCAGG TTGGACGGCA GGTCCAGGTC TGGGGGGCA TCTGGATGTC CACCCCTTG GGGGCTGAAG TGCCAGAGGG TGACCTGGAT  
GGGGGGGCAA GCACTCTCC AACCTGGCT CCAGGCTCCAG ACCGGGGCT AGACCTACAG GTCCCCGAAAC CCCCAGCTTC ACCGCTCTCC ACTGGCACCTA  
AACCTAATTC TTGATGGCCA TGAAGGTGGC AGGGGGGAAG TATTCGACTG GGCTACGGTC CGGGGGCTTG TGAAGGCAA CTCTTCTC EGGGGAGGCA  
TTCGATTAGG AACTACGGGT ACTTCCACCG TGGGGCTTC ATAGCTGAC CGCAGTCCAC CGGGGGGAC ACTTCCGTTT CAGAAACGAG CCCCCCTCCG  
TCTCTGGGA CAACGCTGGG CAGGCACTCG CTGCTGGCTG CGCAGCTTA GACATCACT CTGGCTGGAA ATACCCGCC GGTGGAGGG CGTGGGGCTG  
AGAGGGCTT GTGGGACGEC GTGEGTGAAG CACCCCGAC CGCTACAAAT CTGACTTGA GACCGCACCT TATGGGGGG CGACGGTCCG CTACCCGAC  
GGGGGAAAGA TCGCTGAAAAA TTTGGGAC CATCTCCACA TTCCATTACT AAGGTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAAA GAAAACCTGG  
CCCCCTTCT ACGGGGGGGG GAGGACTTT AAAACCCCTG GTAGAGGTCT AAGGTAATGA TTTCAAATT TATCCTAGTA CTGACTTTT CTTTGTGAA  
GGGGCTCACCT GCATACTTGC GTGAAATTGG CGGGCAGGTC GTGGGGGAAT CCTCTCTGCC TCTCTCTGAC CAGCTECAGA AGGGCTTEGT  
CCCCGACGTG CGACGATGGA CGTATGAAAGC CACTTAAGCC CGGGCTCAAG CACCCCTTA GGGAGGACGG AGGAGACCTG GTGCCACCTCT TCCGGAAAGCA  
TGACGGGACCC AACAGCCCCAG AGTTCGGGAGA AGAACTCGCC GGCTACCTCC CGGATTATCT CGGGGGCCCA ACCCCGCTGA CGGAAATGCTC CAACCTGCCA  
ACTGGGCTGG TTGTCGGGTC TCAAGGGCT TCTTACCCCG CGGATGGAGG CGCTAACTA GCGGGGGCT TCGGGGGACT GGCTTACGAG GTTGGACGGT  
CTGGCAGGGC AAGGCAARAGG TTGGGGGGG ATCTTCTCA AGGGCGAAGA CCTCTGTCAC CGGGGGTGCAC ACACCTACCTA CGAGGTGATC GGGCAGCTGC  
GAGGGTCCGC TTCCGTTCC GAAACGGGGC TAGAAGGAGT TCGGCTTCT CGGAGGAGT CGGGCACGTG TGTGGGGTCTT CGTCCACTAG CCCCCCTCC  
TCTTGGGCAA CGGCATGGC AAAACCCGCA TCATCGAGA GACGGGGCA GGGCAGGAGC GCACCCGCAAC CGCTCTGCCA TGTGGGCTCA TGGGGCTGCC  
ACGAACGTT CGCGTACCCCG TTTGGGGCT AGTAGGGTCT CTGGGGGGCT CGGTCTGCCA CGTGGGGTGC CGGAGGAGGT ACACGGGAGCT ACCGGGAGCT  
GTGGCTTGTG TACATGGGG CCAAGGAGCT TGGGGGGAG CAGGGCAGG TCTACCCCAT CGAGCTGCAC GGGGGGAAGG TCAATCCCCGT GGAATCTGGT  
CACCCAAACAG ATGTAACCCG GGTTCCTGCA AGGGGGGCTC GTGGGGTCC AGATGGCTA CGTGGACGGTC CGGGGGCTCC AGTAGGGGCA CCTTAGACCA

TCCCCCACCC TCAAGGACCC CGTGAATGAA CGCGTGGCC ATTGGACCGC AACCTTCCAC GACTCCCCTG CACCCGGGCC GGGGGCACCC  
 AGGGGGTGGG ACTTCCTGCC CCACTTACTT CGCGACGGCC TAACCTGGG TTGCAAGGTG CTCAAGGTGA TGAAGAACCC GTGGGGGGGG CGGGGGGTGG  
 CATTTCCAAC CATCGTGGCGT GAATTCCACA AGGTGATCTC TGAGGAAGGC AAGCCACAGA TGCTAGAGCC CACCCGGCAAG CTTCCCCACG TTGTTGGTCCC  
 GTAAAGGTTG CTACACCGCA CCTTAAGGTG TCCACTAGAG ACTCCTTCCG TTCCGTGTCT ACCATCTCCG CTGGGGGCTTC GAAGGGCTGC AACACAGGCC  
 CTGTCGCGT GGTGGCTCCA CGCCCATCGC CATGTCGCCA GACTTCATTC ACAGATGAAGG CGTAGACCTC CTGGGGGCTG AGCCAGGGGG TGAAGGCGCTC  
 CACACAGGCCA CCACCGAGGT TCGGGTAGCC GTACAGGCT CTGAAGTAAC TGCTACTTCC GCATCTCCG CAGGGGGAC TCGGTGGCC ACTTCCCCAG  
 GACTCCGGCA ACCACGGGGC AACCATCACC AACGGTCAAGA TCGGCATCTC GCACGGCACC CGTTCTTACG TGATGGCAA CTCCGACGGC CAAAGTGGAC  
 CTGAGGGCGT TCGTGGGGGG TTGCTAGTGG TTGCGAGTCT AGGGTAAAGA CGTGGCGTGG CGRAGGATGG ACTACCGGTT GAGGCTGGCC GTTCACCTTC  
 AGTCTTACTC CATCTCCGCC GGACTTGATT ACCCAGGGT CGGGCACAGC ACAGCACACTT GCACGGCACC CGGGGGCACT ACCTTGGTAT CACCGACGCC  
 TCAGCATGAG GTACAGGGGG CCTGAACTAA TCGGTCGCCA CGCGTGTCTG TCGGTGTGGA CGTGGGGTGG CGGGGGCTGA TGCAACATA GTGGCTGGC  
 GAAGCCCTCC AAGCATTCGA GTAGCCTCGC CGCGTACGAA GCATCATCGC CGGGCACTGG ATCTCTACA CGCGTTCGCC TACGACTCAA GGGGGCGAAC  
 CTTGGGGAGG TTGCTAAGGT CATCGGAGGG CGCGATGCTT CGGTACTAGG CGCGGTGACC TTAGGACTCT CCCCAAGGGG ATGCTGAGT CCCGGGGTCC  
 ACCGGGGAGG AGGAAGGGCA GAACTTAACC ATCCTCGTCT CCTATCCGG CGTGGCAGC AGGAGCTTG ACCATGGCC CGGCACCCCTC CAAAGAAATC  
 TGGGGCTTC TCGTGGGGTCTT CTGAAATTGG TAGGACCCACCG GCATAGGGGG CGCACCCCTG TTCTCCAAAC TCGTACGGGG CGCGTGGGAG CTTCTTTAG  
 CAGAAGCTGAT CCTGAAGGAC AACCGATGAG CGGTTACGAC GATCTTTTG CGCACGGCTC GACAGGTCA GGGGAGGGGG CCTTGTGTTCC CTTCATCATG  
 GTCTTGACTA GGACTTCTG TTGCTACTC GCCTATGCTG CTAGAAAAC CGCTGGGAG CTGTCGGAGT CCCCTCCCCG GGAAGACAGG CAAAGTAGAC  
 CTGAGGGACC CTTCAACCAGA GGAGGGCTTC CAGATCATCT CCACACCAAT CGAACCTGGG CGAGATGCC TGGAACTTGG CGTACCTTC TCGGACCCAG  
 GACTCGTGGTGAAGTGGTCT CTCCTGGAAAG GTCTAGTAA GGTGTGTTA CGTGGCACCG CGTCTACGTC ACCTTCARCC CGATGGAAAG AGGCTGGGTC  
 TTGGGGATEGG CCCCCACCGTC CGGGAAATCCC ACCTCCGGG ACTCGACGGG GGGGCACCG TAGACAGGGC ACTCCAGGAG ATCAAGGGGG TGGGGCGAGC  
 AACGGCTACC CGGGTGGGAG CGGGCTAGGG TGGAGGGGGG TGAGCTGGG CGGGGGTGG ATCTGTCGG TGAGCTCGTCA TAGTTGGCC ACCGGGGTCC  
  
 CTACCCAGAG GTTCCCATCG CAATGCTCAT CTACGGCAAC CTTCCTTCA CCGGTGGCTT GGATGGCTTC TACCAAGAGT TCGCTGAAGC TGGGGCAGAC  
 GATGGCTTC CAAAGGTAGC CTTACGGTA GATGCCGTG CAAGGAAGT CGGCACCGAA CCTACCGAAG ATGTTCTCA AGGGACTTCC ACCGGGTCTC  
 TCCATCTCC TCCCAAGACGT CCCAGTCCGCA GAGGGCCAC CGTTTCTGC ACCACCCGA GTTCATCCC TTTACATGCC TCCGGCCAC CGCAGGGAGA  
 AGGTAGGAGG ACCGGTCTGCA CGGTCAAGGG CTTCCGGTGC CGAAAGAGG CGTGGGGCT TAACTAGGT AAATGTAGCG AGGCGGGTTC CGTGGCTCT  
 ARAACCTCGA GGGTGTCTCC CGCCGATCAA AGGGCTACAT CTACCCATC TCCGGGACG CGTCAACCGG CACCGAACGT GAATCATCAA CGAACGGCT  
 TTGGGGAGCT CCCACAGGG CGGGCTAGTT TCCCGATGTA GATGCGGTAG AGGGGGTGC CGCAGTGGCC GTGGCTGCA CTAGTGGGT GGCTGGGG  
 GTCCGGAGTC GTGGACAACA TCAAGAAATT TGATGGCCCA CCCATCCCTCT TGGGCTTGG CGTCTCATCC CCTCAGCAGG TGGCAGACCC GATGGCAGC  
 CAGGGCTCAC CACCTGTGTG AGTTCTTAA ACTACGGCTT GGGTAGGAGA ACCCGAACCC CTGCACTAGG GGACTCGTGC ACCCTCTGG CTAACGTCG  
 CGTGGCTTCCG GTGGGATCAC CGGTTCCGGC ATCAACAAAGA TCAATTGCTTC CCACTGGGA CGTGGACCC CGAACCCCTC CACCAATTGGA GATATGGAC  
 CGCACGAAGG CACCGTAGTG CCCAAGGGCC TACTGGTCT AGTAACGAG GGTGACGCTT CCTACTGGTGG CGTGGTAAGCT CTATACTCC  
 GTTTGAAGAA GGATCTCACT GAGTTCTGCT CTGGGACTGTA AGGCAGGGAC CAAGAAAGTT TACCCCTTA AAATGGCAA TGTTCACGT GAAACATTCT  
 CAAACTCTT CCTAGAGTGA CTCAAGTAGA GACGGTGAAT TCCGTGCTG GTTCTTCAA ATCCGGAAAT TAACACCGT ACAAGTGCCTA CTTGTAAGA  
 GAGACAATGT AGAAACATCA AAGAAGCCAC CTCCCTAGCTC TCGGGCTGGG AGGGGGCTTC TTGTTGGG GTTGGAGCTT TCTCAGGGTT TTGGAGATCT  
 CTCTCTTACA TCTTCTGAGT TTCTTGGTG GAGGATGGAG AGGGGGAGGG TCCGGCGAG AAACAAACCC CAAATCCCTT AGAGTCCCAA AACCTCTAGA  
 TAGCTTCGAG CGGGCTGGGT AGGAGGGGGG CGGGGGAGGGAG CAATCTAGG GTAGCTCCGA GCCCCAGGGG TTGGAGTGGC ATCACCGTCC CGCTTGGCCA  
 ATCCAGGCTC CGGGCACCCCA TCCCTGGGG CGGGCTCCCTC GTTACAATCC CATCCAGGCT CGGGGTGGG AACCTCACCG TAGTGCAGG CGGAAGAGGT  
 CGGGGCTACC GTTGGGAGCT GGATCC  
 CGGGGGATGC CAACCCCTCGA CCTAGG

特開昭62-244382(6)

- 2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。
- 3) DNAが人工的に合成されたDNA又は微生物に由来するDNAである特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。
- 4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。
- 5) 微生物がブレビパクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。
- 6) 微生物がブレビパクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。
- 7) DNAが1部置換、変異又は削除されたDNAである特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。
- 8) DNAがプラスミド又はファージ由來のベクターに組込まれたDNAである特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。
- 9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNAを用いるレトロアブトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラキン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリプトファン、Y チロシンを示す。)

なお、第2式はトリプE酵素、第3式はトリプG酵素、第4式はトリプD酵素、第5式はトリプC酵素、第6式はトリプB酵素、第7式はトリプA酵素のアミノ酸配列を示す。)。

第 2 式

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTNPVHFSL	DVRYBEDASA	LFAULCGTTA	DDAALLESAD	ITTKNGISSL	AVLKSSVRIT	CTGNTVVVTQP	LTDSGRAVVA	RLTQQLCOYN	TAENTFSPPA
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SDAVDVERERL	TAPSTIEVLR	XLOFESGYSD	ASLPPLLNGCF	AFDFPLETPET	LPAVEESVHT	YPDYQPVLAE	IVLDINNDQDQ	TAKLTGVSNIA	PCELEAEELNK
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSLLIDAAALP	ATEBAYOTTP	HGDGTLEBVVA	DIPDAQFRTO	INELKENIYN	GDIYQVVPAR	TFTAPCPDAF	AAYLQLRATN	PSPYMFYIRG	LHEGRSYELF
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CASPESHLKF	TAANRELQLY	PIACTRPRLCL	NPDGSINDEL	DIRNELDHRT	DANEIADDTH	LVDLARNDLA	RVSVPASRRV	ADLLOVDYRS	RVMHLVSRV
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ATLDPEDAL	DAYRACHHMG	TLTCAPKLR	MELLRGVEKR	RRGSYGGAVG	YLRCNGDHDW	CIVIRSAFVY	DGVAAVQAGA	CVVRDSNPOS	EADETLHKAY
510	520								
AVLNATLAA	CSTLEVIR								

## 第 3 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTHVVVLIDNH DSFVYNLVDA FAVACYKCTV FRNTVVPETI LAANPDLICL SPGPGYPADA GMHMALIERT LGQIPLLGCIC LGYDIALIEYH CGKVEPCGPV  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 UGTTDWMLT DAGVQSPVFA GLATDVEPOH PEVPGRKVPI GRYHSLGCCVW APDGIESLGT CSSEIGDVIM AARTTDOCKAI CLOFHUPESVL SPTGPIILSR  
 210  
 CVEOLLAN-

## 第 4 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTPATLKV LAYLDWPTPT LECIAEVFTP LTVCYEDDH IAALLATIRT RGEOFADIAA AXAFLAAAR PPPITGAGLL DSAGTGGOGA NTINTTGGAS  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 LIANSGGVKL AKHGNRSVSS KSGSAOVLER LWIPPLCVD RAVKWFESAH FTPLFTPAWH PAIAHVOPVR QALKPPTIFN TLGPLLSPAR PERQIMGVAN  
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 ANHCOLIAEV FRELGRTVAL VVHGAGTDEI AVRGTTLWHE LKEDGCTIEDY TIEPEDLGIC RVTLEDLVCG LTCENAEAMR ATFACTGPDA HRDALAASAC  
 310 320 330 340 350  
 AMPYLNGDVD SLKDGAOKAL SLLADATTOR WLAKBEEIDY SEXESSND-

## 第 5 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTSNNLPTVL ESIVEGRCH LEEIRARIAN VDODALPKST RSLFDLSNQG RGCCRFINHEC KSNSPSLGHM REHYOPGEIA RVYSRYAAAI SVLCEPDRC  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 GDYDHLATVG ATSHLPVLCK DFIIIDPVQVR PARYFGADAT LLMLSVDDE EYDALAAEA RFDLDDILTEV IDEEEVARAI KLGAKIFCVN HRRNLHDLSD  
 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 LDRSRRLSKL IPADAVLVSE SGVROTEVTR QLGGSNSAFL VGSQTSQEN VOLAARELYV GPNKVCCGLTS PSAAQATARAA GAVYGGGLIFE EASPRNVSR  
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
 TSQXLIIAEP NLRYVAVSVRR TSGYKDLVLD CIFAVOIDAP LOGSTEAEKA LIAAVREEVG POVQVWRAIS MSSPLGAEVA EGDVOKLILD ANEGCSGEVF  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
 DHATVPAAVK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV CCAGLDINSG VEYPAGACTW GWGECRRAA ENFRDNLNP LLKV -

## 第 6 式

10            20            30            40            50            60            70            80            90            100  
 MTEKENLGGG TLLPAYFGEF CGDFVAESLL PALKDOLERAF VDATNSPEPR EELCCYLRDY LGRPTPLTEC SNLPLACEGK GFAIRIFLRBE DLVHGGAHKT  
 110            120            130            140            150            160            170            180            190            200  
 HOGIGOVLLA KRMGKTRITA ETGAGQHCTA TALACALMGL ECVVYMGAKD VARQPNVYR HOLBGAKVIP VESCGSTLKD AVHEALRDWT ATFHESHYLL  
 210            220            230            240            250            260            270            280            290            300  
 GTRAGPHPPFP TIVREFHKV1 SEEAKAQMLE RTGKLPDVVV ACVGGGSNAI GMFAADFIDDE GVELVGAEP A CEGLDGCKHG ATITHGQIGI LNCTRSYLMR  
 310            320            330            340            350            360            370            380            390            400  
 NSDCOVEEESY SISAGLDYPG VGHSTHTCCTP PARTTLVSPV PKPSKNSSSL ARYEGIIIPRT GJLTRVRLRL KRANKTAEEEG QNLTILVSL S CRGDOKDVDH  
 410            420  
 ACTLEEKPEL ILKDNR

## 第 7 式

10            20            30            40            50            60            70            80            90            100  
 MSRYDDLFDD ASTRSGECAF VPFIMLSDPS PEEAFQIIST AIERGADALE LGVPPFSDPVA DGPTVAESNL RALDGATVD SALEQIKRVR AAYPEVPICM  
 110            120            130            140            150            160            170            180            190            200  
 LIYGNVPFTR GLDRFYDDEA EACADSTILLP DVPVREGAPP SAAAGIDPIY IAPANASEXTI LEGVSAASKG YIYAIISRDCY TGTERESSTD GLSAVVDNIK  
 210            220            230            240            250            260            270            280            290  
 KFDGAPILLG FGISSSPQHVA DATAAGASGA ITGSAJTKII ASHCEGEHPW PSTIRDMDCL KKDLTEFISA TEGSDDEGLG L

- 11) アミノ酸配列が一部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。
- 12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。
- 13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。
- 14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。
- 15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアティニエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。
- 16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるシートリブトフ

タンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればプレビパクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌 (Coryneform bacteria) は、バージース・マニュアル・オブ・データーミネイティブ・バクテリオロジー (Bargy's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版 599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

プレビパクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

特開昭62-244382(9)

プレビバクテリウム・サッカロリティクム	
	ATCC 14066
プレビバクテリウム・インマリオフィルム	
	ATCC 14068
プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム	
	ATCC 13869
プレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
プレビバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
プレビバクテリウム・チオゲニタリス	
	ATCC 19240
コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	
	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	
	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミカム	
	ATCC 13032, 13060
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	
	ATCC 17965

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細胞には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアティュエーター、さらにリードペプチドをコードする領域(*trpL*)、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子(*trpE*, *trpG*)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(*trpD*)、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子(*trpB*, *trpA*)の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものという。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細胞のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

し（例えばH. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619(1963)の方法が使用できる。）、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を探取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離（クローン化）できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼイシ

ョンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、巾広い種類の制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその一部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくは*E. coli*, *B. subtilis*において増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- (1) pAM 330 特開昭58-67699参照
- (2) pAM 1519 特開昭58-77895参照
- (3) pAJ 655 特開昭58-192900 参照
- (4) pAJ 611 同 上
- (5) pAJ 1844 同 上
- (6) pCG 1 特開昭57-134500 参照
- (7) pCG 2 特開昭58-35197参照
- (8) pCG 4 特開昭57-183799 参照
- (9) pCG 11 同 上
- (10) pCG 1 特開 (Mautin/Ajico)

- (11) pBL 100 特開 ( )  
 (12) pBR 322  
 (13) pC 194

ベクターDNAの開裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシュリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandal, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970))受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルバ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

ブレビバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shioi, H. Sato, H. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 36, 2315(1972))、ブレビバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

法、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153(1977))細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen., Genet., 168, 111(1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, D.A., Nature, 274, 398(1978); Rinnen, A., Hicks, J.B. and Frink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のバチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得るとができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shioi, S. Sugimoto, H. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 39, 627(1975))、ブレビバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アヴァセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、D-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(H. Hagiwara, H. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 39, 345(1975))等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成若積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含有する澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好気的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にトリプトファンの生産高が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、プレビバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末端の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えば、インタ

ーフェロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが常用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるレートリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行ひ得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アティュエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合せた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異なるように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる説得体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びレートリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むプレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるレートリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

#### 実施例1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

##### 1-1 プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225(PERM-P4370) を1gのCMG培地（ペプトン1g/dl、酵母エキス1g/dl、グルコース0.5g/dl、及びNaCl 0.5g/dlを含み、pH7.2に調整したもの）に植菌し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDSで溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に3.5mgのDNAを得た。

##### 1-2 ベクター-DNAの調製

ベクターとしてpAJ1844（分子量5.4メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するプレビアクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037を100mLのCMG培地に接種し、30℃で対数増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心により上清を得た。フェノール処理ののち、2容のエタノールを加えてDNAを沈澱回収した。これを少量のTEN緩衝液(20mMトリス塩酸塩、20mM NaCl、1mM EDTA(pH 8.0))に溶解後、塩化セシウム-エチジウムプロミド密度勾配平衡遠心によりプラスミド画分を分離し、最終的にpAJ1844プラスミドDNA約200μgを得た。

### 1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1で得た染色体DNA 10μgと1-2で得たプラスミドDNA 5μgとを制限エンドヌクレアーゼPst Iでそれぞれを37℃で1時間保持し、切断した。65℃で10分間加熱した後、両反応液を混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、T4ファージ由来のDNAリガーゼによって10℃で24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈澱を採取した。

### 1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

プレビアクテリウムラクトフェルメンタムのアンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株No.38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠損株No.30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変異処理することにより分離した)をDNA受容菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストトランシスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を5mLのCMG液体培地で対数増殖期の初期まで培養し、ペニシリンGを0.6ユニット/mL添加後、さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により菌体

を集め、菌体を0.5Mシューコース、20mMマレイン酸、20mM塩化マグネシウム、3.5%ペナッセイプロス(Difco)からなるSMMP培地(pH 6.5)0.5mLで洗浄した。次いで10mL/mLのリゾチームを含むSMMP培地に懸濁し30℃で20時間プロトプラスト化を図った。6000×g、10分間遠心分離後、プロトプラストをSMMPで洗浄し0.5mLのSMMPに再度懸濁した。この様にして得られたプロトプラストと1-3で調製したDNA 10μgを5mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレン glycolを最終濃度が30%になる様に添加した後、DNAをプロトプラストに取り込ませるために室温に2分間放置した。このプロトプラストをSMMP培地1mLで洗浄後、SMMP培地1mLに再懸濁し、形質発現のため、30℃で2時間培養した。この培養液をpH 7.0のプロトプラスト再生培地上に塗布した。プロトプラスト再生培地は蒸留水1Lあたりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン1.2g、KC10.5g、グルコース10g、NaCl2g・KH2O 8.1g、CaCl2・2H2O 2.2g、

ペプトン4g、粉末酵母エキス4g、カザミノ酸(Difco社)1g、K2HPO4 0.2g、コハク酸ナトリウム13.5g、寒天8g及びクロラムフェニコール3μg/mLを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニーが出現してきたのでこれを最少培地(2%グルコース、1%硫酸アンモニウム、0.3%尿素、0.1%りん酸二水素カリウム、0.04%硫酸マグネシウム7水塩、2ppm鉄イオン、2ppmマンガンイオン、200μg/Lサイアミン堿性塩、50μg/Lピオチン、カザミノ酸(Difco)3g/L、クロラムフェニコール10μg/mL、pH 7.0、寒天1.8%)にレブリカし、クロラムフェニコール耐性かつトリプトファン要求性の消失した株をAS60を用いた区分から2株、No.38を用いた区分から1株、No.30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、いずれのプラスミドもベクタープラスミドpAJ1844よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、N<sub>o</sub>38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、N<sub>o</sub>30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

#### 1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851をN<sub>o</sub>38に、ptrpB301をN<sub>o</sub>30に再度形質転換した。

生じたクロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4、にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンタ-

ゼβサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一郎が欠けているのではないかと示唆された。

#### 1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2 で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

#### 実施例2.

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング  
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムAJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性のN<sub>o</sub>1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI或いはSalI、又はXbaIで完全に切断し、E.coliのベクターpUC18(Messing,J.,et al.,Gene,33,103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、E.coli JM109(Messing,J.,et al.,Gene,33,103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside),IPTG(isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンビシリソを含むし寒天培地にプレートティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー(合計約1500コロニー)をニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kbのPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼイション(Grunstein,M.,Walls,J.:Methods in Enzymology,68,379,Academic Press Inc.,New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブクロ-

ンを得た。BamHI区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。

その結果、ptrpE97はptrpE36、ptrpE42はptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36のPstI断片及びptrpB301のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

#### 実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリシン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

### 3-1 *trpC*遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド  $\lambda$ p<sub>trpE97</sub> から第1図に示した約2 kb. のSstI-EcoRI断片を分離し、SstI, EcoRIで切断したpUC19(Messing,J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985)に連結し、lacプロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約2.6 kb. のSstI-Hind III断片を分離しSstI, Hind IIIで切断したpUC18(Messing,J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985)に連結し、lacプロモーターからの転写が可能になるように配置し、*E. coli* CGSC No 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lacZ53, trpL8,  $\lambda^-$ )を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いはSstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、*E. coli*の要求性を消失させた。

### 3-2 *trpA*遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド  $\lambda$ p<sub>trpE97</sub> から第1図に示した

列はプレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要なRNAポリメラーゼの結合部位(*trp*プロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子(*trpE*, *trpG*)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(*trpD*)、N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼインドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子(*trpB*, *trpH*)に対応するDNA配列、及び停止配列(ターミネーター)を含むことが判明した。

又、プロモーターと*trpE*構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッシャーに関与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アティュエーションに関与するリガーベブチド(*trpL*)をコードする領域とアティュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された(第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

約2.4 kb. のNruI-BamHI断片を分離し、SmaI, BamHIで切断したpUC18に連結し、lacプロモーターからの転写が可能になるように配置し、*E. coli* CGSC No 5644 (trpA33, rha-T,  $\lambda^-$ )を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

### 実施例4.

#### トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例1で得られたp<sub>trpE36</sub>、p<sub>trpD3851</sub>、p<sub>trpB301</sub>及び実施例2で得られたp<sub>trpE97</sub>を有する形質転換株から各々プラスミドの調製を行った。各々のプラスミドの挿入DNA断片についてpUC18或いはpUC19又はM13mp10(Messing,J. and Vieira, J., Gene 19, 269(1982))を用いるdideoxy chain termination法(Sanger,F. et al., Proc.Natl. Acad.Sci. USA 74, 5463(1977))により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示すDNA塩基配列が得られ、この塩基配

### 実施例5.

#### プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、p<sub>trpE97</sub>、或いはp<sub>trpE36</sub>のEcoRI-Hind III断片(約550 bp.)を*E. coli*のプロモータープローブベクター pKK195-6(アンビシリントリプトファン耐性(Ap)、テトラサイクリン(Tc)感受性)(Brosius,J., Gene 27, 151(1984))にサブクローンした。得られた組換えプラスミド p<sub>trpP01</sub>は*E. coli*中でTc耐性を発現した。

さらに、pAM330由来のトリメトブリム耐性のベクター、pAJ226のPstI切断部位にPstIで切断した上記組換えプラスミド  $\lambda$ p<sub>trpP01</sub>を連結し、プレビバクテリウム AJ11225を形質転換したところTc耐性の発現が認められた。この組換えプラスミド p<sub>trpP02</sub>を有する形質転換株のTc耐性度は第1表に示したように、Trp.存在下ではTcに対する感受性が増した。従ってこの領域には、プロモーターとオペレーターが存在すると考えられる。

第1表 カザミノ酸を添加した最少クロラムフェニコール耐性度

	トリプトファン耐性度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	トリプトファン添加 トリプトファン添加 (1 mg/mL)
pTrpP01 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0
pTrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	2.5	5
pTrpP03 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0
pTrpP04 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0
		6.00 <
		6.00 <
		6.00 <
		2.00

\*pE003TR in *E. coli*のトリプトファンプロモーターを有している

スミド pAJ234を用いて、レートリプトファン生産について検討した。

pAJ234を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムM247を用いて述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られたAJ12195(FERM-P8014)を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産培地(グルコース13.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 g、フマル酸1.2 g、酢酸3 mM、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g、d-ビオチン50  $\mu\text{g}$ 、サイアミン塩酸塩2000  $\mu\text{g}$ 、メチオニン400  $\mu\text{g}$ 、チロシン650  $\mu\text{g}$ 、大豆蛋白酸加水分解液「味液」50 mM、 $\text{CaCO}_3$  5.0 gを水1 Lに含む、pH 6.5.) 2.0 mMを500 mMの坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30°Cにて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中のレート

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII断片をAluI或いは、HaeIIIで切断し、各断片をpKK222-8上にサブクローン化した(第5図)。その結果AluI-HindIII断片(516bp)及びHaeIII-HindIII(135bp)上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を*E. coli*のプロモーター探査ベクターpKK232-8(Ap耐性、クロラムフェニコール感受性)を用いて得ており、AluI-HindIII断片(516bp)上にプロモーターが存在することを確認した。

## 実施例6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(*trpD*)、N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子(*trpB*, *trpA*)の增幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングしたプレビバクテリウムラクトフェルメンタムトリプトファンオペロンのうち*trpD*, *trpC*, *trpB*, *trpA*の4遺伝子を有する組換えア

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)ATCC 8042を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株のレートリプトファン蓄積量

菌株	レートリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dL
FERM P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dL

尚、M 247を得るために寄託されたAJ 12195より宿主細胞を損うことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失なわれることもあるし、「除去」操作によって除くこともできる(Bact. Rev., 36, p361-405(1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195をCMG液体培地に接種し、37°Cで一晩培養(高温処理)後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しないCMG寒天培地に塗布し、30°Cで1~3日間培養する。かくしてクラロム

フェニコール感受性株として分離される株が  
N 247 である。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図

組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図

第2図

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの塩基配列決定のための戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18、pUC19或いはM13mp10にクローン化し、矢印で示した方向へ、dideoxy法により塩基配列を決定した

第3図

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの制御領域  
- プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのtrpE構造遺伝子の5'上流域の塩基配列並びに推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

## RNAの2次構造-

第4図

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの構造とプロモーター、オペレーター領域の単離、同定のための戦略

第5図

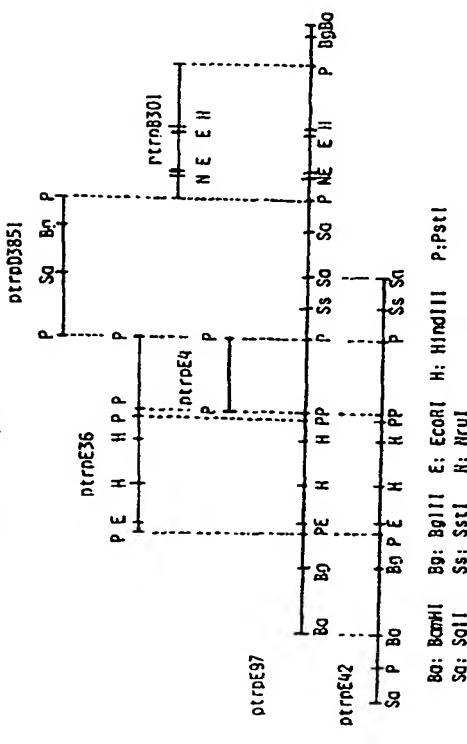
プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの構造とプロモーター、オペレーター領域の限定のための戦略  
-35 及び -10 は E. coli のプロモーターコンセンサス配列の -35 、及び -10 領域に相当する領域を示す

第6図

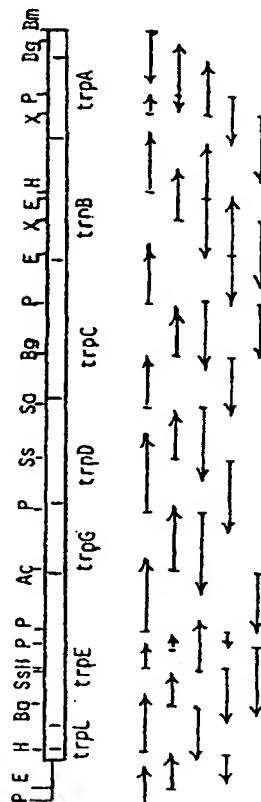
プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンのターミネーターの構造

特許出願人 味の素株式会社

第1図



第2図

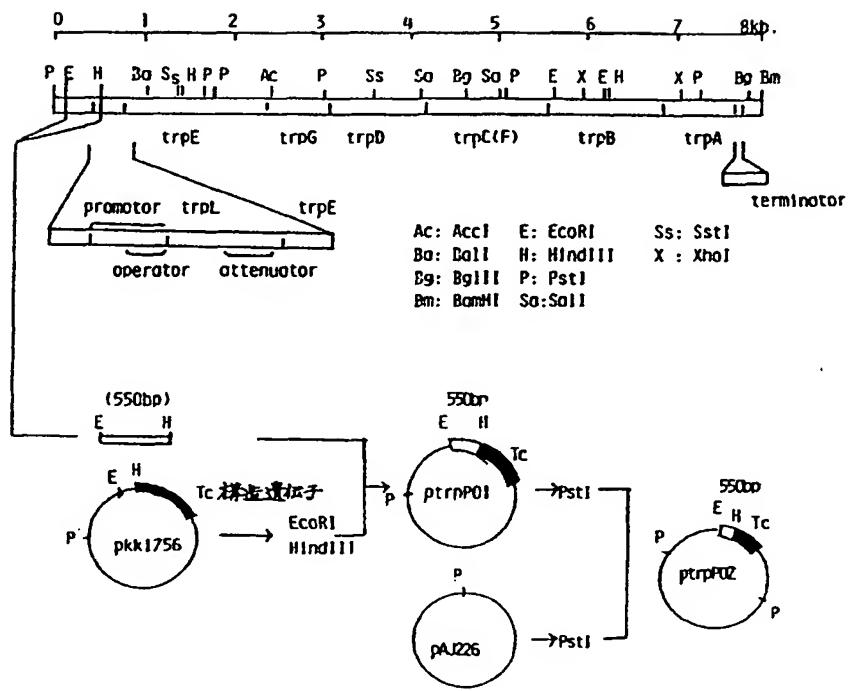


卷三

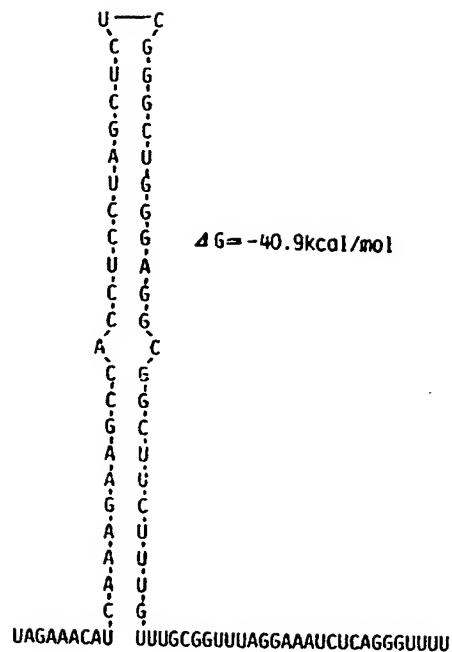
國  
5  
宋

Loc 111	AGGATCTTGGCTGAACT ATTACCTTCC CGTATACTA GAAAGCTCC CTAATGCC CGAATGCA TCCTCTGC ACCATCTGA TAACTGTTG GCTTAACTT GCTTGAGC GACTTACGGG GTTCTAAC	A111	-35	-10	Hind III
---------	---	------	-----	-----	----------

#### 第 4 図



第 6 図



第1頁の続き

// 51 Int. Cl. 1 識別記号 厅内整理番号  
C 12 P 21/02 6712-4B  
(C 12 P 13/22)  
C 12 R 1:13)  
(C 12 P 13/22  
C 12 R 1:15)

手 指 福 正 出

昭和61年6月3日

待評序段官微

## 1. 事件の表示

昭和61年特許第87600号

## 2. 芳明の名跡

トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされるペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方略及びトリプトファンの製造法

### 3. 補正をする者

## 事件との関係 特許出願人

住所 球根都中央区泉城一丁目 5番 8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 欽山勝 張

#### 4. 沢正命令の日付

自足

5. 極光により増加する発明の数 なし

6. 指正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄  
および図面(第1図、第2図、第4図)

以上

圖 1 第

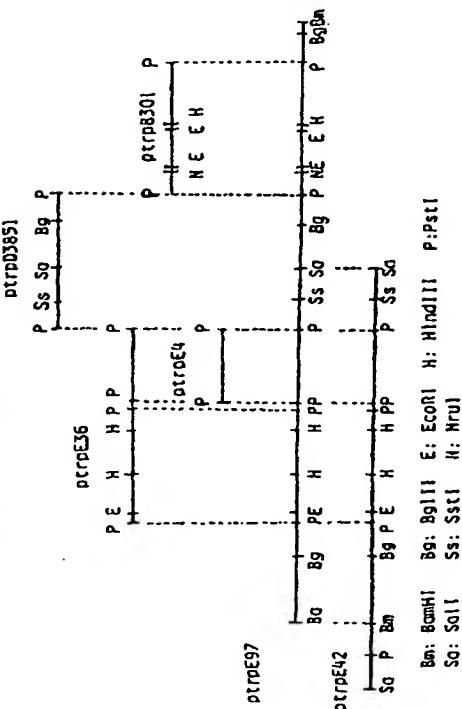
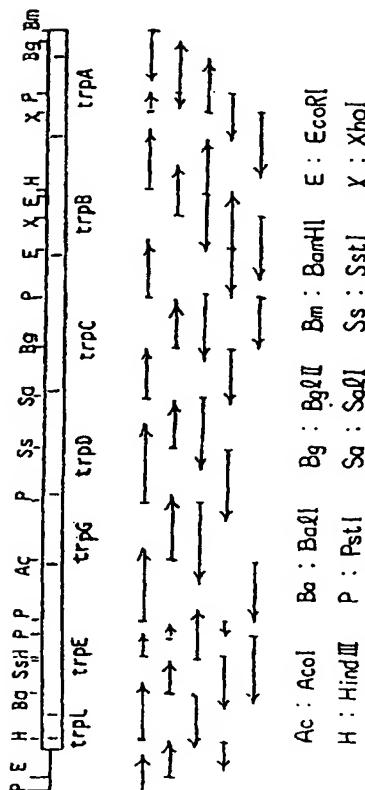


圖 2 第



## 第 4 図

